

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen:

103 09 368.0

Anmeldetag:

03. März 2003

Anmelder/Inhaber:

Aventis Behring GmbH, Marburg/DE

Bezeichnung:

Pharmazeutische Zubereitung mit RNA
als Cofaktor der Hämostase

Priorität:

06.08.2002 DE 102 36 038.3

IPC:

A 61 K 31/7105

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 17. April 2003
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

Agurks

5 AVENTIS BEHRING GMBH
ANR 8177007

2002/M014J (A54)
Dr. Pfe/jn

10 Pharmazeutische Zubereitung mit RNA als Cofaktor der Hämostase

15 Gegenstand der Erfindung sind pharmazeutische Zubereitungen, die neben Blutgerinnungsfaktoren zusätzlich noch natürliche oder synthetische Ribonukleinsäure (RNA) oder biologisch aktive Bruchstücke der RNA oder RNA-degradierende Substanzen wie Ribonukleasen enthalten.

Es ist bekannt, dass die Prozesse der Hämostase (Blutgerinnung und Fibrinolyse),
20 die lokal und zeitlich begrenzt nach Einsetzen einer Gefäßläsion ablaufen, durch spezifische Interaktionen zwischen aktivierten Gefäßwandzellen, Blutplättchen und Proteinfaktoren gesteuert werden. Über zumeist ionische Wechselwirkungen der Calcium-bindenden und Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren wird eine Lokalisierung der in der Hämostase wirksamen Proteine auf vor allem negativ geladenen Biomembranen an der Verletzungsstelle erreicht. In vitro können diese Wechselwirkungen und damit die Aktivierung des Blutgerinnungssystems sowie das Ausmaß der Bildung eines Fibringerinnsels durch komplexierende Substanzen wie Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) oder Citrat verhindert werden. In vivo verbietet sich der Einsatz solcher Antikoagulantien; hier kann über die Therapie mit
30 oralen Vitamin K-Antagonisten die Calciumbindung der Gerinnungsfaktoren verhindert werden, so dass das Ausmaß der Hämostase herabgesetzt wird.

Neben der Bildung von negativ geladenen Phospholipiden durch Freilegung von Zellmembranen der Blutplättchen und anderer vaskulärer Zellen kommt es nach
35 Verletzung der Gefäßwand auch zur Exposition intrazellulärer Komponenten, insbesondere der zytosolischen Proteine. Gut erforscht ist, dass das

- 5 Blutgerinnungssystem zwei unterschiedliche, kaskadenförmige Aktivierungswege von im Plasma anwesenden Gerinnungsfaktoren umfasst. Je nach auslösendem Mechanismus dient bevorzugt der endogene oder der exogene Weg zur Initiation der Gerinnung. Bei einer Gewebeverletzung wird als Starter des exogenen Gerinnungsweges das Thromboplastin (tissue factor, TF) mit Phospholipiden von 10 den betroffenen Zellen exponiert. Die besondere Funktion des Blutgerinnungsfaktors VII bei diesen Vorgängen ist aus der deutschen Offenlegungsschrift 199 03 693 bekannt. Das membranständige Thromboplastin kann sowohl den Gerinnungsfaktor VII (FVII) als auch den zirkulierenden, 15 aktivierte FVII (FVIIa) binden. Dieser TF-FVIIa-Komplex führt in Gegenwart von Calcium-Ionen und Lipiden zur Bindung des FX, der durch limitierte Proteolyse in seine aktivierte Form (FXa) überführt wird. FXa wiederum führt durch Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin zur Bildung von Fibrin und damit letztendlich zum Wundverschluss.
- 20 Nach den bisherigen Kenntnissen vollzieht sich die weitere Aktivierung des an das Thromboplastin gebundenen FVII vor allem autokatalytisch, wird aber nach der Initiation der Gerinnungskaskade vor allem durch FXa und Thrombin unterstützt, was zu einer deutlichen Verstärkung der Reaktionskaskade führt.
- 25 Aus diesen Befunden konnte die Erkenntnis abgeleitet werden, dass in bestimmten klinischen Situationen die Applikation von FVIIa oder FVIIa-enthaltenden Konzentraten indiziert ist. Bei Patienten, die zum Beispiel unter Hämophilie A leiden und als Folge der Verabreichung von FVIII Antikörper gegen FVIII entwickelt haben, wird die sog. "FVIII bypassing activity" (FEIBA) des FVIIa genutzt. Dabei hat sich 30 gezeigt, dass FVIIa gut verträglich ist und zu keiner Thromboseneigung führt, sich aber dazu eignet, die Gerinnung in einem begrenzten, jedoch ausreichendem Umfang zu gewährleisten. Rekombinanter FVIIa wird bereits therapeutisch und prophylaktisch verwendet. Aus Blutplasma gewonnener FVII kann ebenfalls aktiviert und danach verwendet werden. Zu dieser Aktivierung können nach den 35 bisherigen Kenntnissen Proteasen wie Thrombin verwendet werden, die aber als

5 solche die Gerinnung selbst stark aktivieren und zu einer Thrombosegefährdung
führen können. Deshalb ist die anschließende Entfernung oder Inaktivierung von
Thrombin erforderlich und führt zu Ausbeuteverlusten. Die Anwendung von FXa
oder FIIa (Thrombin) ist wegen der damit verbundenen Thrombosegefährdung
häufig kontraindiziert und nur in Notfällen, zum Beispiel bei extremen Blutverlusten
10 und unstillbaren Blutungen angezeigt.

FVIIa wird nur in sehr geringen Konzentrationen im Plasma gesunder Menschen
gefunden. Über die Bildung und Herkunft des im Blut zirkulierenden FVIIa ist bisher
nur sehr wenig bekannt. Es wurde deshalb angenommen, dass Spuren von
15 exprimiertem oder bei einer Zellzerstörung freigesetztem Thromboplastin dabei
eine Rolle spielen könnten. Trotz der intensiven Erforschung aller mit der
Blutgerinnung zusammenhängenden Vorgänge konnten bisher jedoch keinerlei
Hinweise dafür gefunden werden, dass Bestandteile der verletzten Zelle bei der
Auslösung der hämostatischen Prozesse eine entscheidende Rolle spielen
20 könnten.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass unter den aus verletzten
Geweben und Zellen freigesetzten Bestandteilen die extrazelluläre RNA einen
wichtigen initialen Cofaktor für das Auslösen der (a) extrinsischen und (b)
25 intrinsischen Gerinnungskaskade darstellt. Diese Beobachtung gibt Anlass, die
Funktion der RNA oder von biologisch aktiven Bruchstücken der RNA bzw. von
RNAsen in hämostatischen Prozessen genauer zu untersuchen und
pharmazeutische Zubereitungen zu entwickeln, denen zur Förderung der
Hämostase natürliche oder synthetische RNA oder biologisch aktive Bruchstücke
30 der RNA, oder denen zur Inhibierung von extrazellulären Funktionen von RNA
entsprechende Ribonukleasen zugesetzt sind. Extrazelluläre RNA stellt dabei die
natürliche "fremde" Oberfläche zur Aktivierung des plasmatischen Kontaktphase
Systems dar, dessen Initiierung bislang durch Kaolin oder andere polyanionische
Substanzen in vitro beschrieben wurde.

- 5 Gegenstand der Erfindung ist deshalb eine pharmazeutische Zubereitung, die eine
zur Förderung der Blutgerinnung ausreichende Menge von natürlicher oder
synthetischer RNA oder von einem oder mehreren die Blutgerinnung fördernden
Bruchstücken von RNA, Peptidnukleinsäuren, Ribozymen oder RNA-Aptameren
enthält. Vorzugsweise umfasst eine derartige Zubereitung zusätzlich noch einen
10 Aktivator für einen plasmatischen Blutgerinnungsfaktor. Besonders geeignet als
Aktivator ist (a) die den Faktor VII aktivierende Protease (FSAP) oder ihr Proenzym
sowie (b) Komponenten der Kontaktphase wie Faktor XII, Kininogen und
Prækallikrein. Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung eine pharmazeutische
Zubereitung von Ribonukleasen, die die prokoagulatorische Wirkung von RNA
15 aufheben oder verhindern.

Den erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen liegt die Erkenntnis zugrunde, dass die RNA den wirksamsten Cofaktor für das Proenzym des FSAP darstellt und zur Aktivierung dieses Enzyms führt. Diese Wechselwirkung wird
20 sowohl für natürliche RNA aus Zellhomogenaten oder Überständen aktiverter Thrombozyten als auch mit aus zytosolischer RNA (vor allem ribosomale RNA) gewonnenen Fraktionen oder synthetischer RNA erzielt. Dabei besteht offensichtlich kein zellspezifischer Cofaktoreffekt, da auch bakterielle und virale RNA wirksam ist und sich die RNA-Moleküle in den verschiedenen Zelltypen sehr
25 ähnlich sind, so dass offenbar die hohe negative Überschussladung die Funktionen von RNA als Cofaktor der FSAP bestimmt.

Diese Erkenntnisse werden durch die Beobachtung untermauert, dass FSAP spezifisch an RNA binden kann und durch eine hypertone Kochsalzlösung auch
30 wieder dissoziiert wird. Bemerkenswert ist also, dass unter physiologischen Bedingungen eine spezifische Bindung an FSAP nur durch RNA, nicht aber durch DNA feststellbar ist.

Der Erfindung liegt somit die Erkenntnis zugrunde, dass durch die Wechselwirkung von RNA mit FSAP, welches der wirksamste Aktivator des Gerinnungs-
35 Proenzymfaktors VII ist, die extrinsische Aktivierung der Blutgerinnung induziert

- 5 wird. Dieser durch Gewebsverletzungen spezifisch aktivierte Gerinnungsweg wird also durch den neuen Cofaktor (natürliche oder synthetische) RNA in Gang gesetzt.

Gleichzeitig stellt RNA den natürlichen Cofaktor zur Aktivierung des Kontaktphase Systems dar, was im Vollblut, Plasma und im gereinigten System gezeigt wurde.

- 10 Damit eröffnen sich neue und ganz unterschiedliche Wege durch geeignete pharmazeutische Zubereitungen positiv wie negativ Einfluss auf die Vorgänge der Hämostase zu nehmen.

- Ein neuer Ansatzpunkt hierfür ist die Verwendung von RNA-abbauenden und
15 inhibierenden Verbindungen zur Einwirkung auf hämostatische Prozesse. Wird durch Zuführung von RNA-spaltenden oder inhibierenden Substanzen der die Blutgerinnung beeinflussende Cofaktor RNA inaktiviert, steht er dann nicht mehr für die Aktivierung von FSAP oder des Kontaktphase Systems zur Verfügung. Hieraus ergibt sich, dass RNAsen die Wirkung von FSAP aufheben und damit auch den
20 Blutgerinnungsfaktor VII bzw. die intrinsische Gerinnung unwirksam machen können. Das hat ein neues anticoagulatorisches Prinzip zur Folge, das therapeutisch nutzbar ist. RNA-degradierende oder maskierende Komponenten (wie z.B. Bindungsproteine) können also wichtige therapeutische Wirkungen entfalten, die hochspezifisch, ohne Nebenwirkungen, selektiv die Initiierung des
25 Gerinnungssystems verhindern und damit einen deutlichen anticoagulatorischen oder antithrombotischen Effekt haben.

- Aus der deutschen Offenlegungsschrift 199 03 693 ist nun außerdem bekannt, dass die den Faktor VII aktivierende Protease (FSAP) auch die Eigenschaft hat, eine
30 effektive Aktivierung der Einketten-Urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) und des Einketten-tPA (sctPA, single chain tissue plasminogen activator) zu bewirken, also als Plasminogenaktivator-Aktivator (PAA) agieren kann. Die Aktivierung der Plasminogen-Aktivatoren kann in Anwesenheit von Plasminogen in einer gekoppelten Reaktion auch durch die Plasminbildung

- 5 selbst oder durch die von Plasmin bewirkte Auflösung eines Fibringerinnsels bestimmt werden.

Hieraus ergibt sich, dass RNA oder biologisch aktive Bruchstücke der RNA auch einen deutlichen Einfluss auf die Förderung der Fibrinolyse nehmen.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind deshalb pharmazeutische Zubereitungen, die zusätzlich zu einer zur Förderung der Fibrinolyse ausreichenden Menge RNA, einem oder mehreren die Fibrinolyse fördernden Bruchstücken von RNA oder RNA Analoga wie Peptidnukleinsäuren, Ribozymen oder RNA-

15

Aptameren einen Aktivator für ein plasmatisches Fibrinolytikum enthalten. Als Aktivator für ein plasmatisches Fibrinolytikum kann vorzugsweise die Plasminogenaktivatoren-aktivierende Protease FSAP oder ihr Proenzym eingesetzt werden. Insbesondere ist bekannt, dass FSAP die fibrinolytischen Eigenschaften der Prourokinase sehr effizient zu aktivieren vermag. Deshalb kann RNA durch

20

Unterstützung der Aktivierung des FSAP-Proenzymes auch zur Initiation und/oder Verstärkung der Fibrinolyse verwendet werden, zum Beispiel im Fall von Fibrinablagerungen oder Thrombosen. Dabei kann die RNA selbst, ihre biologisch aktiven Bruchstücke oder daraus abgeleitete Strukturen in Form von synthetisch hergestellten Molekülen Verwendung finden. Dementsprechend haben auch RNA-abbauende oder inhibierende Substanzen die Wirkung, die Aktivierung von FSAP zu verhindern und damit die Fibrinolyse zu unterbinden.

25

Die besonderen Eigenschaften der FSAP haben bereits zur Entwicklung von zusätzlichen Bestimmungsmethoden geführt, die in der DE 199 03 693 beschrieben sind. Die dort beschriebenen Testmethoden können nun erheblich spezifischer und genauer durchgeführt werden, wenn das Diagnostikum auch noch eine ausreichende Menge von RNA oder von aktiven Bruchstücken der RNA enthält.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb ein Diagnostikum zum quantitativen und qualitativen Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease FSAP oder ihres Proenzymes, bei dem zur Bestimmung
- 10 a) der die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierenden Wirkung oder
- b) der die Gerinnungszeiten verkürzenden Wirkung in globalen Gerinnungstests oder
- 15 c) der die Plasminogenaktivatoren aktivierenden Wirkung oder
- d) der den Faktor VII aktivierenden Wirkung

eine ausreichende Menge von RNA oder von biologisch aktiven Bruchstücken der RNA eingesetzt wird.

20 Die Bestimmung der durch FSAP bewirkten Inaktivierung der Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va beruht darauf, dass eine FSAP enthaltende Lösung mit dem Faktor VIII/VIIIa oder dem Faktor V/Va inkubiert wird und dann die verbleibende Menge der genannten Faktoren mittels eines üblichen Aktivitätstests gemessen und daraus durch Vergleich mit einer Standardkurve die FSAP-Menge quantitativ bestimmt wird. Dabei wird die Inkubation der Proteaseaktivität nach vorgegebenen Zeitabschnitten durch die limitierte Zugabe von Aprotinin inhibiert, welches den Vorteil hat, dass es in diesen Konzentrationen die anschließenden Messungen des Testsystems nicht beeinflusst. Danach werden 25 die restlichen Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren mittels eines dem Fachmann geläufigen Tests gemessen. Besonders bewährt hat sich hierfür ein Testsystem, bei dem der sog. Coamatic® Faktor VIII Test (Chromogenix AB) eingesetzt wird, der im wesentlichen die Faktoren IXa und X enthält, wobei in Gegenwart eines Thrombininhibitors die entstandene Menge an FXa mittels einer Umsetzung eines

30

- 5 chromogenen Substrats quantifiziert wird. Diese ist wiederum der FVIII- oder
FVIIa-Menge proportional.

Trotz der FV- und FVIII-Inaktivierung konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von FSAP zu Blut, zu an Plättchen reichem Plasma oder Plasma die Gerinnungszeiten verkürzte, also der procoagulatorische Effekt in verschiedenen sog. "globalen Gerinnungstests" überwog. Unter diesen Testsystemen versteht man zum Beispiel die nicht-aktivierte partielle Thromboplastinzeit (NAPTT), die Prothrombinzeit (PT) und die Rekalzifizierungszeit. Da die Verkürzung dieser Gerinnungszeiten, gemessen zum Beispiel in sog. Coagulometern, mittels Thromboelastographie oder aber in chromogenen Tests, mit der Konzentration einer gerinnungsfördernden Substanz korreliert, kann umgekehrt anhand einer Eichkurve aus der Gerinnungszeit auf die Konzentration der Substanz in einer Probe geschlossen werden. Entsprechend lässt sich die Konzentration des FSAP mit Hilfe von ausgewählten Gerinnungs-Globaltests bestimmen.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch ein Diagnostikum zum quantitativen oder qualitativen Nachweis von FSAP durch Bestimmung der die Blutgerinnungszeiten verkürzenden Wirkung mittels

- 25 a) der nicht-aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (NAPTT)
b) der Prothrombinzeit (PT)
c) der Plasma-Rekalzifizierungszeit oder
30 d) der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT)

eine ausreichende Menge von RNA oder von biologisch aktiven Bruchstücken der RNA enthält. Durch den Zusatz von RNA oder seinen Bruchstücken wird auch 35 dieser Test spezifischer und empfindlicher.

- 5 Weiterhin kann die prokoagulatorische Aktivität von RNA dazu genutzt werden, die genannten Diagnosetests zur Bestimmung von Blutgerinnungszeiten im Vollblut oder Plasma mit diesem Kofaktor zu bestücken. Neben natürlicher RNA (transfer- oder ribosomaler RNA) können auch synthetische RNA wie poly IC, poly C oder poly AU als prokoagulatorische Kofaktoren dienen, da sie stabiler als natürliche
- 10 RNA gegenüber Ribonukleasen (im Blut, Plasma) sind. Die genannten Formulierungen sind (unabhängig von FSAP) vor allem bei der Aktivierung der intrinsischen Kontaktphase beteiligt und können daher zur Messung entsprechender Blutgerinnungszeiten in der Diagnostik Einsatz finden.
- 15 Schließlich kann auch die durch FSAP bewirkte Aktivierung der Einketten-Urokinase oder der Einketten-tPA für ein Testsystem zum Nachweis von FSAP verwendet werden, das durch den Zusatz von RNA oder von aktiven Bruchstücken der RNA noch verbessert wird. Dabei wird die Aktivität der aktivierten Plasminogenaktivatoren mit Hilfe zum Beispiel chromogener Substrate gemessen.
- 20 Die Aktivierung der Plasminogenaktivatoren kann in Anwesenheit von Plasminogen in einer gekoppelten Reaktion auch durch die Plasminbildung selbst oder durch die von Plasmin bewirkte Auflösung eines Fibringerinnsels bestimmt werden.
- 25 Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen können als Blutgerinnungsmittel entweder allein oder zusammen mit anderen die Proteaseaktivität erhöhenden Substanzen wie Heparin oder dem Heparin verwandten Substanzen wie Heparansulfat und/oder Calciumionen eingesetzt werden. Die Anwendung eines derartigen Mittels kann zum Beispiel unter Ausnutzung seiner FVIII bypassing activity (FEIBA) angezeigt sein, wenn
- 30 Unverträglichkeiten gegenüber den FVIII und/oder FIX und/oder FXI und/oder den Proteinen der Kontaktphase, wie FXII, zum Beispiel wegen des Vorliegens von Antikörpern, bestehen oder andersartige Mangelsituationen vorliegen. Auch die Anwendung ex vivo zur allgemeinen Blutungsprophylaxe oder zur Stillung von Blutungen kann mit der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitung zur
- 35 Förderung der Blutgerinnung durchgeführt werden.

5

Andererseits kann durch die Aktivierung von Plasminogenaktivatoren durch die erfindungsgemäße pharmazeutische Zubereitung auch eine limitierte Proteolyse der Einketten-PAs stattfinden, die zu ihrer Aktivierung geeignet ist. Das führt zu einer Fibrinolyse durch Aktivierung zum Beispiel der Prourokinase, die den Einsatz
10 der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen bei thromboembolischen Erkrankungen wie bei der Beinvenenthrombose, dem Herzinfarkt oder Schlaganfällen angezeigt erscheinen lässt.

Die erfindungsgemäßen Zubereitungen können also zur endogenen oder exogenen
15 Aktivierung von Plasminogenaktivatoren wie Prourokinase oder tPA verwendet werden. Diese Anwendungsmöglichkeit steht nicht im Widerspruch zu der Tatsache, dass FSAP auch procoagulatorisch wirken kann. Die Frage, welche der beiden Reaktionen überwiegt, regelt sich wahrscheinlich durch die Verfügbarkeit
20 der physiologischen Substrate. Nach dem derzeitigen Stand des Wissens wird der Faktor VII im Plasma moderat aktiviert und hält ständig eine bestimmte Konzentration an FVIIa aufrecht, um plötzlichen Gefäßverletzungen sofort entgegenwirken zu können. Dagegen findet man beim tPA und beim Urokinase-
Plasminogenaktivator nur ng-Mengen in 1 ml Blutplasma. Erst bei Fibrinablagerung
oder Thromben erhöht sich die Konzentration an Plasminogenaktivatoren durch
25 Sekretion oder Synthese, die nach Aktivierung lokal, besonders thrombusgebunden, ihre thrombolytische Aktivität durch Plasminogen-aktivierung entfalten. In Anwesenheit von Einketten-PAs, besonders lokal begrenzt, könnte deren Aktivierung die FVII-Aktivierung überwiegen, wodurch eine Anpassung an die physiologische Situation möglich ist. Entsprechend kann FSAP auch die
30 Hämostase regulieren, wodurch eine Substitution mit FSAP oder ihres Proenzymes bei angeborenen oder erworbenen Mangelzuständen geeignet ist.

Da sich gezeigt hat, dass die Plasminogenaktivator (vor allem Pro-Urokinase) verstärkende Wirkung der FSAP besonders durch Calcium und/oder Heparin oder
35 heparinähnliche Substanzen wie Dextransulfat gefördert wird, können zur

5 erfindungsgemäßen Auflösung von fibrinhaltigen Thromben besonders vorteilhaft pharmazeutische Zubereitungen eingesetzt werden, die außer RNA oder biologisch aktiven RNA-Bruchstücken zusätzlich noch lösliche Calciumsalze und/oder Heparin oder heparinähnliche Substanzen enthalten. Weitere Details der Erfindung werden in folgenden Beispielen verdeutlicht, ohne dass der Gegenstand der Erfindung
10 dadurch in irgendeiner Weise eingeschränkt werden soll:

Beispiel 1. RNA aus verschiedenen Quellen wirkt als prokoagulatorischer Kofaktor

RNA aus

- (a) kultivierten humanen Fibroblasten (rRNA),
- 15 (b) aus Hefe (tRNA),
- (c) aus E. coli,
- (d) aus Q β -Phagen (Einzelstrang RNA)
- (e) synthetischer Quelle (poly IC, poly C, poly AU)

wurde in gleicher Konzentration ohne und nach Vorbehandlung mit RNase A in
20 einem turbidometrischen Gerinnungstest eingesetzt und die Rekalzifizierungszeit
gemessen. Alle RNA-Typen waren in der Lage, die Gerinnungszeit signifikant zu
verkürzen (Quantifizierung in "Kaolin-Equivalent Units (KEU/ml)"), während DNA
keine Wirkung zeigte. Vorbehandlung der RNA-Proben mit RNase A führte zur
Inaktivierung der prokoagulatorischen Aktivität; lediglich im Falle von E. coli RNA
25 war diese partiell resistent gegen RNase A-Behandlung. Damit ist eindeutig
gezeigt, dass verschiedene Formen von polyanionischer RNA prokoagulatorische
Aktivität besitzen; Fragmentierung dieser RNA-Typen in niedermolekulare
Bruchstücke führt zum Verlust der prokoagulatorischen Aktivität. Im Vergleich zu
authentischer rRNA oder tRNA zeigten synthetische Einzelstrang- und
30 Doppelstrang-RNA prokoagulatorische Aktivität in Gerinnungstests in der folgender
Abstufung: poly IC > poly C > poly AU > poly dIC.

Beispiel 2. Verhalten von RNA im Plasmamilieu: RNA-Gedächtnis

Obwohl Ribonukleasen im Blut (und in anderen Körperflüssigkeiten) die Menge an
35 zirkulierender RNA kontrollieren, war es möglich, die prokoagulatorische Funktion

5 von RNA im Plasma zu bestimmen. Um diesen Zusammenhang zu klären, wurde das Schicksal einer bestimmten Menge RNA im Plasma über die Zeit verfolgt: Während hochmolekulare RNA im Plasma mit einer Halbwertzeit von ca. 5 min degradiert wurde und nach 30 min nicht mehr nachweisbar war, konnte die prokoagulatorische Aktivität dieser RNA noch nach 90 min und länger unverändert
10 nachgewiesen werden. Dieses Phänomen des "RNA-Gedächtnisses" beruht wahrscheinlich auf der Aktivierung RNA-abhängiger Komponenten im Plasma, die nach Rekalzifizierung mit zur Initiierung der Blutgerinnung beitragen. Sehr wahrscheinlich ist damit RNA im Blutplasma auch verantwortlich für die
15 Phänomene der "latenten" Gerinnung bzw. eines "hyperkoagulablen" Zustandes, dessen Voraussage bzw. Prävention einen sehr wichtigen Stellenwert in der Diagnose und Therapie von thrombotischen Komplikationen einnimmt.

Beispiel 3. Mechanismus der RNA-abhängigen Initiierung der Blutgerinnung

Während zum Plasma zugesetzte RNA die durch Tissue factor induzierte
20 Blutgerinnung bei jeder Konzentration dieses Kofaktors steigern konnte, zeigte sich bei Kaolin-induzierter Blutgerinnung ein äquivalenter Effekt der RNA. Dies deutet auf die Beteiligung von RNA als anionischer Kofaktor (fremde Oberfläche) bei der Initiierung des Kontaktphasesystems der Blutgerinnung hin. Um diesen Sachverhalt zu klären, wurden in einem gereinigten System Prækallikrein und Kininogen zur
25 Reaktion gebracht und die Menge an gebildetem Kallikrein bestimmt. Im Verhältnis zur Pufferkontrolle führte der Zusatz von RNA zu einer signifikanten Steigerung der Kallikreinbildung, während Vorbehandlung der RNA mit RNase A diesen Effekt verhinderte. Experimente in Faktor XII- und Faktor VIII-defizienten Plasmen unterstrichen die Funktion der RNA als Kontaktphase-Kofaktor, und in Prækallikrein-
30 defizientem Plasma zeigte RNA (im Vergleich zu Normalplasma) keine Wirkung. Zusammengenommen beweisen diese Resultate, dass, äquivalent zu Kaolin (artifizielles Material), das natürliche Material RNA nach Exponierung mit dem Kontaktphasesystem die intrinsische Initiierung der Blutgerinnung in Gang setzt.

5 Beispiel 4. Nachweis von RNA in Patientenplasma

Die Abnahme von Blut erfolgte in der Gegenwart von ca. 200 units/ml RNase Inhibitor mit nachfolgender Präparation des Plasmas oder alternativ wurde nach Blutabnahme und Plasmagewinnung diesem der Stabilisator PAQ-gene (Qiagen) zugesetzt, um RNA-Hydrolyse zu verhindern. Nach Präparation der RNA (mittels Trizolmethode) wurde diese auf Nylonfilter immobilisiert, und mit radioaktiv markierten rRNA-spezifischen Oligos wurde nach Hybridisierung die Menge an Plasma RNA mit Hilfe einer Eichkurve quantifiziert. In Plasmen von Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder Sepsis wurden mit Hilfe dieser Analytik positive Proben identifiziert, deren Gehalt an RNA über dem gesunder Spender lag.

15

Beispiel 5. RNA-Antagonisten

Die prokoagulatorische Aktivität von RNA, vor allem bezogen auf die Initiierung des plasmatischen Kontaktphasesystems, kann durch Vorbehandlung der RNA mit RNase A verhindert werden. So ist es plausibel, dass eine Erhöhung der Konzentration von Ribonukleasen im Plasma zur hydrolytischen Spaltung der Nukleinsäure führt und damit Ribonukleasen antikoagulatorische Wirkung entfalten. Da Endothelzellen vermehrt RNase A produzieren und ins Blut sezernieren, wie an Zellkulturen gezeigt wurde (Landre et al., 2002), kommt eine antikoagulatorische Therapie mit Ribonukleasen dem natürlichen Regulationsprinzip im Gefäßsystem sehr nahe. Alternativ könnten Ribonukleasen auch eine antikoagulatorische Wirkung gegenüber Ribozymen oder RNA-Aptameren entfalten, da diese Substanzen, ähnlich wie natürliche RNA, eine Kontaktphasenaktivierung bewirken könnten.

30 Beispiel 6. Zelluläre Funktionen von RNA

Da RNA eine gewisse Überlebenszeit auch im Plasmamilieu hat, wurde die Wirkung dieses polyanionischen Materials auf Gefäßwandzellen, nämlich Endothelzell-Monolayer in Kultur, getestet. Ein sehr sensibler funktioneller Test für die zelluläre Wirkung von extrazellulärer RNA ist die Änderung der Endothelzell-Permeabilität, die an dichten Monolayern von mikrovaskulären zerebralen

- 5 Schweineendothelien untersucht wurde. In konzentrations-abhängiger Weise erhöhte RNA die Permeabilität dieser Zellen, eine Vorinkubation mit RNase konnte diese Wirkung von extrazellulärer RNA verhindern. Da eine Beeinflussung der Endothelzell-Permeabilität im Bereich einer Gefäßverletzungsstelle notwendig für die einsetzenden Wundheilungsreaktionen ist, wird dieser zellulären Funktion
10 extrazellulärer RNA eine große Bedeutung zugemessen.

5 AVENTIS BEHRING GMBH
ANR 8177007

2002/M014J (A54)
Dr. Pfe/jn

10 Patenansprüche:

- 15 1. Pharmazeutische Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine zur Förderung der Blutgerinnung ausreichende Menge von natürlicher oder synthetischer RNA oder von einem oder mehreren die Blutgerinnung fördernden Bruchstücken natürlicher oder synthetischer RNA, oder RNA-Analoga wie Peptidnukleinsäuren, Ribozyme oder RNA-Aptamere enthält.
- 20 2. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie zusätzlich zu der die Blutgerinnung fördernden Menge von natürlicher oder synthetischer RNA oder von einem oder mehreren die Blutgerinnung fördernden Bruchstücken von natürlicher oder synthetischer RNA, Peptidnukleinsäuren, 25 Ribozymen oder RNA-Aptameren einen Aktivator für einen plasmatischen Blutgerinnungsfaktor enthält.
- 30 3. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie als Aktivator die den Faktor VII aktivierende Protease (=FSAP) oder ihr Proenzym enthält.
- 35 4. Verwendung einer pharmazeutischen Zubereitung nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie zur Förderung der Blutgerinnung eingesetzt wird.

- 5 5. Pharmazeutische Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie eine zur Förderung der Fibrinolyse oder Hemmung der Koagulation ausreichende Menge einer oder mehrerer die RNA abbauender oder inhibierender Verbindungen mit ribonukleolytischer Aktivität oder RNA-komplexierender Kapazität enthält.
- 10 6. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie zusätzlich zu einer zur Förderung der Fibrinolyse oder Hemmung der Koagulation ausreichenden Menge einer oder mehrerer die RNA abbauender, inhibierender oder maskierender Verbindungen einen Aktivator für ein plasmatisches Fibrinolytikum enthält.
- 15 7. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie als Aktivator für ein plasmatisches Fibrinolytikum die Plasminogenaktivatoren aktivierende Protease FSAP oder ihr Proenzym enthält.
8. Diagnostikum zum Nachweis u.a. von post-operativen hyperkoagulablen Zuständen, Schwangerschaftskomplikationen, Tumorstatus, akutem Myokardinfarkt oder Sepsis, **dadurch gekennzeichnet**, dass ein gegenüber Gesunden erhöhter Gehalt plasmatischer RNA nachgewiesen wird.
- 20 9. Diagnostikum zum quantitativen oder qualitativen Nachweis der den Blutgerinnungsfaktor VII aktivierenden Protease FSAP oder ihres Proenzymes, **dadurch gekennzeichnet**, dass es zur Bestimmung
- a) der die Blutgerinnungsfaktoren VIII/VIIIa oder V/Va inaktivierenden Wirkung oder
- 30 b) der die Blutgerinnungszeiten verkürzenden Wirkung in globalen Gerinnungstests oder,
- c) der die Plasminogenaktivatoren aktivierende Wirkung oder
- 35

- 5 d) der den FVII aktivierende Wirkung

eine ausreichende Menge von natürlicher oder synthetischer RNA, von aktiven Bruchstücken natürlicher oder synthetischer RNA oder RNA-Analoga wie Peptidnukleinsäuren, Ribozyme oder RNA-Aptamere enthält.

10

10. Diagnostikum nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Bestimmung der die Blutgerinnungszeiten verkürzenden Wirkung mittels

15

- a) der nicht-aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (NAPTT) oder

- b) der Prothrombinzeit (PT) oder

- c) der Plasma-Rekalifizierungszeit oder

- 20 d) der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (APTT)

eine ausreichende Menge von natürlicher oder synthetischer RNA, aktiven Bruchstücken natürlicher oder synthetischer RNA, Peptidnukleinsäuren, Ribozymen oder RNA-Aptameren enthält.

11. Diagnostikum nach den Ansprüchen 8 und 9, dadurch gekennzeichnet, dass es zur Bestimmung der die Plasminogen-Aktivatoren aktivierenden oder verstärkenden Wirkung durch die Aktivierung

- 30 a) der Einketten-Urokinase (scuPA, single chain urokinase plasminogen activator) oder
b) der Einketten-tPA (sctPA, sigle chain tissue plasminogen activator)

5 eine ausreichende Menge von natürlicher oder synthetischer RNA, , aktiven Bruchstücken natürlicher oder synthetischer RNA, Peptidnukleinsäuren, Ribozymen oder RNA-Aptameren enthält.

12. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,
10 dass sie eine zur Behandlung von Sepsis ausreichende Menge einer oder mehrerer die RNA abbauender, inhibierender oder komplexierender Verbindungen enthält.

10

Zusammenfassung:

Pharmazeutische Zubereitung mit RNA als Cofaktor der Hämostase

15

Es werden pharmazeutische Zubereitungen beschrieben, die zur Förderung der Blutgerinnung als auch zur Förderung der Fibrinolyse ausreichende Mengen von RNA oder ein oder mehrere die Blutgerinnung fördernden Bruchstücke von RNA enthalten. Insbesondere werden sie vorteilhaft zusammen mit einem Aktivator für 20 hämostatische Prozesse, wie der den Faktor VII aktivierenden Protease (FSAP) eingesetzt.